Trousse pour la détermination radioimmunologique de la trypsine humaine (htrypsin)

Contenu de la trousse :

1 flacon de **^{125}I-trypsine humaine,** < 90 kBq, contenant 22 ml de tampon, d'albumine bovine, d'immunoglobulines de lapin, d'azoture de sodium et un colorant rouge orangé.

1 flacon de **sérum** de lapin **anti-trypsine,** contenant 10,5 ml de tampon, de l'albumine bovine et de l'azoture de sodium.

7 flacons de **standards** de trypsine lyophilisés, contenant chacun 0,5 ml de sérum de cheval et de l'azoture de sodium, concentration allant de 0 à 1200 ng/ml de trypsine humaine

1 flacon de **sérum de contrôle** de trypsine, contenant 0,5 ml de sérum humain et de l'azoture de sodium, concentration indiquée sur l'étiquette.

1 flacon de **réactif précipitant**, contenant 55 ml de tampon, du sérum de chèvre anti-IgG de lapin, de l'albumine bovine et de l'azoture de sodium.

1 tube de **réactif de lavage** (1 comprimé).

1 mode d'emploi.

Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium comme conservateur. Eviter toute absorption des réactifs ainsi que tout contact avec la peau ou les muqueuses. L'azoture de sodium peut réagir avec les canalisations de plomb et de cuivre pour former des azotures de métaux fortement explosifs. Les diluer abondamment lors de l'évacuation des déchets.

1. Introduction

Un diagnostic différentiel est souvent difficile à établir chez les patients présentant un syndrome abdominal, notamment lorsqu'il s'agit d'affections pancréatiques. Les moyens analytiques permettant d'examiner les fonctions pancréatiques et les contrôles ultérieurs de ces dernières sont donc d'un grand intérêt du point de vue diagnostic. Les enzymes du pancréas exocrine, telles que l'amylase, la lipase et la trypsine, qui participent à la digestion intestinale des hydrates de carbone, des graisses et des protéines, revêtent dans ce cas une très grande importance. De ces enzymes, toutefois, seule la trypsine est secrétée uniquement dans le pancréas; la détection de cette enzyme constitue donc un test spécifique en ce qui concerne le pancréas exocrine.

1.2. Données chimiques et biologiques de la trypsine

La trypsine est une enzyme protéolytique, une endopeptidase dotée d'une spécificité vis-à-vis des liaisons carboxyliques des groupements L-arginyle et L-lysyle. Elle participe à la digestion des protéines dans l'intestin. Du point de vue chimique, la trypsine est une protéine se composant de 201 acides aminés, et dont le poids moléculaire est de 22 900.

Comme d'autres enzymes protéolyptiques d'origine pancréatique, la trypsine est élaborée dans les cellules acineuses du pancréas exocrine sous forme de trypsinogène, proenzyme inactive, et déversée dans le duodénum en passant par le canal pancréatique. Le trypsinogène existe sous deux formes qui sont dissociées en trypsine enzymatiquement active au moyen d'entérokinase, enzyme formée dans les cellules du duodénum. L'entérokinase détache du trypsinogène l'héxapeptide Val-$(Asp)_4$ -Lys en présence d'ions Ca^{++}, libérant ainsi le centre biologiquement actif de la molécule de trypsine masqué jusque-là. La trypsine peut en outre activer le trypsinogène par autocatalyse.

La trypsine semble être éliminée pour une faible partie telle quelle par l'intestin, comme des examens coprologiques l'ont révélé. En outre, les trypsinogènes, la trypsine et, probablement aussi la trypsine liée à un inhibiteur pancréatique, peuvent passer dans le sang par l'intermédiaire du liquide interstitiel. L'activité trypsique est toutefois bloquée dans le sang par trois inhibiteurs spécifiques: α_1 -antitrypsine, α_2 -macroglobuline et l'inhibiteur inter-α-trypsine. Une faible activité protéolytique se maintient toutefois dans le sérum, comme le révèle l'hydrolyse de substrat synthétique; cette activité n'est pas imputable à la trypsine.

1.2. Principe du RIA-gnost® Trypsine

On peut doser la trypsine dans le suc duodénal et pancréatique par spectrophotométrie au moyen de l'hydrolyse de substrat synthétique. On ne peut toutefois utiliser cette méthode pour doser la trypsine dans le sang, étant donné que les trypsinogènes sont biologiquement inactifs et que l'activité enzymatique de la trypsine est bloquée par les inhibiteurs, comme indiqué ci-dessus.

Ce problème ne se pose néanmoins pas si l'on se sert des propriétés immunologiques de la molécule de trypsine au lieu de ses propriétés enzymatiques pour effectuer le dosage.

La trousse RIA-gnost®Trypsin permet le dosage radioimmunologique de l'enzyme trypsique dans le sérum humain et d'autres liquides biologiques d'après le principe de l'analyse par compétition. Il s'agit d'un dosage radioimmunologique par double anticorps. La trypsine libre est séparée de celle liée aux anticorps spécifiques à l'aide d'un anticorps anti-IgG.

Lors de la première incubation, la trypsine sérique et le traceur trypsine marqué à l'^{125}I se fixent sur des anticorps hautement spécifiques de la trypsine, le degré de fixation du traceur ^{125}I-trypsine aux anticorps étant inversement proportionnel à la trypsine sérique présente.
Au cours de la deuxième incubation, le complexe de la trypsine et ^{125}I-trypsine avec l'anticorps entre en réaction avec une gammaglobuline anti-lapin. Il se forme un précipité. Après centrifugation, on décante le surnageant et on mesure à l'aide du compteur gamma à scintillation l'activité du traceur marqué à l'^{125}I présente dans le précipité. L'activité servant de mesure de la concentration sérique de trypsine est évaluée par comparaison avec des standards préparés dans les mêmes conditions.

Chaque trousse RIA-gnost® Trypsin contient une quantité de réactifs suffisante pour doser 42 échantillons de patients en double à l'aide d'une courbe d'étalonnage. Le sérum de contrôle de trypsine sert à effectuer le contrôle analytique du dosage.

La plage de mesure s'étend de 0 à 1200 ng/ml de sérum, avec un maximum de précision entre 80 et 500 ng/ml.
A l'exception des standards et du réactif de lavage, les réactifs de la trousse sont prêts à l'emploi. Ils doivent être conservés entre + 2 et + 8 °C.

Le dosage radioimmunologique RIA-gnost® Trypsin permet de mesurer la trypsine sérique en tant que protéine; les inhibiteurs présentes ne gênent pas le test. Le dosage est spécifique de la trypsine, du trypsinogène et des formes inhibées par les enzymes.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de standard de référence reconnu à l'échelle internationale pour la trypsine. Une comparaison des résultats fournis par le RIA-gnost®Trypsin et de ceux d'autres examens de la trypsine n'est possible que dans une mesure limitée.

2. Résultats cliniques et caractéristiques spécifiques obtenus avec la trousse RIA-gnost®Trypsin

Résultats cliniques :

2.1. Valeurs normales

On ne connaît pas la fonction de la trypsine sérique enzymatiquement inactivée, mais on peut mettre celle-ci en évidence dans le sérum tant que le pancréas exocrine exerce son activité.

Chez les sujets sains, la concentration de trypsine sérique oscille entre 140 et 400 ng/ml (médiane: 200 ng/ml).
La concentration de la trypsine sérique ne varie pratiquement pas selon le sexe, mais semble par contre dépendre de l'âge du sujet, car on a relevé des valeurs un peu plus faibles chez les enfants.

2.2. Pancréatite chronique

Dans les pancréatites chroniques, les méthodes diagnostiques dont on dispose aujourd'hui permettent d'observer des variations de concentration de la trypsine, de l'amylase, de la lipase, du bicarbonate dans le suc duodénal ou du volume de celui-ci. En outre, une calcification du pancréas peut être mise en évidence par radiographie. Les examens diagnostiques sont assez difficiles à effectuer, désagréables pour le patient et, de plus, peu fiables. Aussi, le dosage radioimmunologique est-il d'un intérêt considérable.

Chez les patients présentant une pancréatite chronique, on observe des valeurs de trypsine sérique inférieures à 140 ng/ml dans 50 % des cas. Cela est certainement dû à une lésion importante des cellules acineuses du pancréas.

Par contre, dans 20 % des cas de pancréatite chronique, les valeurs ont été supérieures à la limite des valeurs normales de 400 ng/ml, ce qui indique vraisemblablement une phase aiguë de la pancréatite (cf. 2.3).

La violence des douleurs abdominales ne correspond pas au taux de trypsine sérique, mais une stéarrhée est souvent accompagnée d'une diminution sensible du taux de la trypsine sérique.

Chez les patients présentant une pancréatite chronique, mais dont les valeurs basales trypsiques sont «normales», la concentration de la trypsine sérique augmente considérablement pendant les 20 à 120 minutes suivant le test de stimulation à la sécrétine puis à la pancréozyme. Cette augmentation semble être imputable à une plus grande perméabilité des tissus du pancréas due à l'inflammation. En effet, on n'a pu observer aucune augmentation de la trypsine sérique chez les sujets sains à qui l'on fait subir le même test de stimulation.

2.3. Pancréatite aiguë

Chez les patients présentant une pancréatite aiguë, on observe toujours une augmentation sensible du taux de la trypsine sérique. Les valeurs obtenues vont de 600 à 6 500 ng/ml.

2.4. Carcinome du pancréas

On a trouvé chez des patients ayant un carcinome du pancréas un taux de trypsine sérique faiblement augmenté (450 à 1 200 ng/ml), mais cette différence n'est en général pas observée. En l'absence de pancréatite et/ou d'insuffisance rénale, il est nécessaire d'effectuer d'autres examens diagnostiques.

2.5. Fibrose kystique du pancréas

Il est possible d'utiliser le dosage radioimmunologique de la trypsine pour déceler la fibrose kystique du pancréas. Pour de plus amples informations, cf. RIA-gnost Trypsin neonatal.

Remarque :

Il semble certain que la partie exocrine du pancréas après stimulation ne fonctionne pas en tant qu'unité, puisque la corrélation entre les taux d'amylase, de lipase et de trypsine sérique ne correspond pas toujours à ce qu'on attend. Cela offre donc des possibilités pour d'autres diagnostics différentiels.
Des concentrations trypsiques sériques normales (plage: 140 à 400 ng/ml) n'excluent pas la possibilité d'une affection du pancréas.
Une augmentation du taux de la trypsine sérine a été observée dans des cas d'insuffisance rénale ; aussi doit-on tenir compte de l'état fonctionnel du rein du malade avant d'interpréter les taux de trypsine.
Compte tenu de la limitation ci-dessus, des valeurs inférieures à 140 ng/ml ou supérieures à 400 ng/ml obtenues lors d'un examen de dépistage chez des patients présentant des symptômes abdominaux peuvent être des valeurs extrêmes de la «normalite».

Caractéristiques spécifiques du dosage :

2.6. Imprécision
Elle a été évaluée à l'aide de 2 échantillons dosés 10 fois dans la même série et dans 15 séries différentes.

Intra-essai

Echantillons	Moyenne (ng/ml)	CV (%)
1	550	2,8
2	167	3,3

Inter-essai

Echantillons	Moyenne (ng/ml)	CV (%)
3	162	4,9
4	483	6,7

2.7. Limite de détection
La limite de détection est définie comme étant la plus petite concentration détectable différente de 0 avec une probabilité de 95 %.
Elle a été évaluée à 8,0 ng/ml.

3. Protocole de dosage

3.1 Matériel nécessaire
Tubes à essai. Micropipettes avec embout plastique interchangeable (ou microdistributeurs) de 100, 200 et 500 µl. Distributeur de 1,0 ml. Eprouvette graduée, bécher. Agitateur, centrifugeuse ≥ 1500 g, compteur gamma réglé pour la mesure de l'iode 125

3.2. Préparation des réactifs
Avant utilisation, porter à température ambiante (+ 18 à + 25 °C) les composants de la trousse qui ont été conservés entre + 2 et + 8 °C.

Reconstituer les standards avec de l'eau distillée selon les indications suivantes :

Décoller les particules de lyophilisat qui pourraient adhérer au bouchon en tapant les **flacons** de standards sur une surface dure. Puis ouvrir les flacons avec précaution et poser les bouchons à l'envers sur la paillasse. Reconstituer avec exactement **500 µl d'eau distillée** (à l'aide d'une micropipette appropriée), reboucher les flacons et attendre la reconstitution complète des lyophilisats (environ 10 min). Pour aider la dissolution et l'homogénéisation de la solution, imprimer au flacon un mouvement circulaire et/ou le rouler entre les mains.
Pour préparer le tampon de lavage, dissoudre le comprimé tampon dans 100 ml d'eau distillée.
Conserver tous les réactifs entre + 2 et + 8 °C.
Pour réaliser un test plus important, il faut rassembler les réactifs provenant de différents coffret d'un même lot. Une seule courbe d'étalonnage suffira pour tous les échantillons à tester. Il est également possible d'établir deux courbes d'étalonnage avec un plus petit nombre d'échantillons de sérum.

3.3. Préparation des échantillons de sérum
Préparer le sérum selon le procédé habituel à partir du prélèvement sanguin.
Aspirer le sérum et l'utiliser immédiatement ou le conserver à une température comprise entre + 2 et + 8 °C pendant 3 jours maximum, ou le congeler à -20 °C.

3.4. Mises en garde et précautions d'emploi
Les matières premières d'origine humaine contenues dans les réactifs de cette trousse ont été testées avec des trousses agréées et trouvées négatives en ce qui concerne les anticorps anti-HIV 1, anti HIV 2, anti-HCV et l'antigène HBs. Cependant aucune méthode d'analyse ne permet à ce jour de garantir totalement qu'une matière première d'origine humaine soit incapable de transmettre l'hépatite, le virus HIV, ou toute autre infection virale. Aussi faut-il considérer toute matière première d'origine humaine, y compris les échantillons à doser, comme potentiellement infectieuse.

3.5. Protocole de dosage (voir tableau)
1 Numéroter un nombre suffisant de tubes à essai (3 à 5 ml) comme indiqué dans le tableau (standards, sérum de contrôle, échantillons de sérum et l'activité totale).

2 Distribuer au moyen de la pipette 100 µl de **standards**, de **sérum de contrôle** ou **d'échantillons de sérum** au fond des tubes à essai préparés à cet effet.

3 Distribuer 200 µl de ^{125}I-**trypsine** dans tous les tubes (y compris ceux de l'activité totale).

4 Distribuer 100 µl de **sérum de lapin anti-trypsine** dans chaque tube (excepté ceux de l'activité totale), agiter pour homogénéiser, incuber 3 h (3 à 5 h) à température ambiante (18 à 25 °C) à l'abri de la lumière directe .

5 Distribuer 500 µl de **réactif précipitant** dans chaque tube (excepté ceux de l'activité totale), agiter pour homogénéiser, incuber 30 min (30 à 60 min) à température ambiante, à l'abri de la lumière directe.

6 Distribuer 1 ml de **réactif de lavage** dans chaque tube (excepté ceux de l'activité totale), centrifuger pendant 15 min à ≥ 1500 g et à 20 °C, puis décanter le surnageant.

7 Mesurer la radioactivité des tubes pendant 1 minute à l'aide d'un compteur gamma. Les tubes de l'activité totale donnent en général entre 40 000 et 20 000 cpm.

3.6. Exploitation des résultats

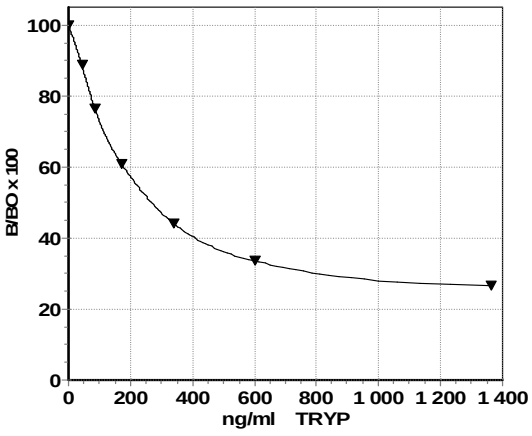
La figure présente une courbe d'étalonnage type établie à l'aide de la trousse RIA-gnost® Trypsin.
Reporter sur du papier millimètre préparé à cet effet d'une part le nombre de coups par minute des étalons S_0 à S_6 et d'autre part les concentrations de trypsine correspondantes en ng/ml. Les points servent à tracer la courbe étalon.
Les valeurs mesurées du sérum de contrôle et des sérums de patients permettent d'obtenir des valeurs moyennes et de lire à partir de la courbe d'étalonnage la concentration de trypsine.

Protocole de dosage du RIA-gnost® Trypsin

	Standards (µl)							Sérum de contrôle (µl)	Sérums (µl)				Activité totale (µl)
N°des tubes à essai	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	C	1	2	3	etc.	T
Standards S_0	100/100												
S_1		100/100											
S_2			100/100										
S_3				100/100									
S_4					100/100								
S_5						100/100							
S_6							100/100						
Sérum de contrôle								100/100					
Sérums									100	100	100	etc.	
^{125}I-trypsine	◄----------200 µl ----------►												
Sérum anti-trypsine	◄----------100 µl ----------►												
	Mélanger; incuber 3 h entre 18 et 25 °C												
Réactif précipitant	◄----------500 µl ----------►												
	Mélanger; incuber 30 min entre 18 et 25 °C												
Réactif de lavage	◄----------1 ml ----------►												
	Centrifuger 15 min à 1 500 g, 20 °C, décanter le surnageant												
	Mesurer la radioactivité du précipité												Compter la solution

Exemple de courbe d'étalonnage

Groupe de tubes	cpm moyens	B/T x 100	B/Bo x 100	Concentration ng/ml
T	35000			
Standard 0	22225	63.5	100	0
Standard 1	19713	56.3	88.7	43
Standard 2	17002	48.5	76.5	85
Standard 3	13535	38.6	60.9	171
Standard 4	9779	27.9	44.0	341
Standard 5	7445	21.2	33.5	602
Standard 6	5929	16.9	26.6	1365
Contrôle	12090	34.5	54.4	220



5. Règles de base de radioprotection

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires couverts par cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée ni à l'homme ni aux animaux.
L'achat, la détention, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur.
L'application des règles de base de radioprotection assure une sécurité adéquate.
Un aperçu en est donné ci-dessous :
Les produits radioactifs seront stockés dans leur conteneur d'origine dans un local approprié.
Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour.
La manipulation de produits radioactifs se fera dans un local approprié dont l'accès doit être réglementé (zone contrôlée).
Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques en zone contrôlée.
Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
Eviter le contact direct avec tout produit radioactif en utilisant des blouses et des gants de protection.
Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes.
Chaque cas de contamination ou perte de substance radioactive devra être résolu selon les procédures établies.
Toute élimination de déchets radioactifs se fera conformément aux réglementations en vigueur.